

8

# BEST AVAILABLE COPY

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-059864

(43)Date of publication of application : 03.03.1998

(51)Int.Cl.

A61K 38/16  
C07K 5/08  
C07K 5/09  
C07K 5/097  
C07K 5/103  
C07K 5/11  
C07K 5/117  
C07K 7/06  
C07K 7/08  
C07K 14/79

(21)Application number : 08-233652

(22)Date of filing : 15.08.1996

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(72)Inventor : TSUDA HIROYUKI  
IIIGOU MASAOKI  
TOMITA MAMORU  
SHIMAMURA SEIICHI  
TAKATSU ZENTA  
SEKINE KAZUNORI

### (54) CANCER METASTASIS SUPPRESSING AGENT FOR ORAL ADMINISTRATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a cancer metastasis suppressing agent for oral administration having low side action and administrable over a long period by using one or two substances selected from specific lactoferrin derivatives as an active component.

SOLUTION: This agent contains one or two substances selected from nonferrous saturated lactoferrins, hydrolyzed lactoferrins, pharmaceutically permissible derivative of the hydrolyzate, salt of the hydrolyzate, peptide originated from the hydrolyzate of lactoferrin, pharmaceutically permissible derivative of the peptide and salt of the peptide. The nonferrous saturated lactoferrin, hydrolyzed lactoferrin, its derivative or a salt of the hydrolyzate among the above active components are preferably administered at a daily rate of 3-3,200mg/kg-body weight. The other active components consisting of the peptide are preferably administered at a daily rate of 0.2-320mg/kg-body weight. The peptide preferably has an amino acid sequence of the formula.

Lys RQ1 RQ1 RQ1 RQ1 Gln RQ1 RQ1 Me: Lys-Lys  
1 5 10

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

12.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-59864

(43)公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/16	ADU		A 6 1 K 37/14	ADU
C 0 7 K 5/08	ZNA		C 0 7 K 5/08	ZNA
5/09			5/09	
5/097			5/097	
5/103			5/103	

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-233652  
 (22)出願日 平成8年(1996) 8月15日

(71)出願人 000006127  
 森永乳業株式会社  
 東京都港区芝5丁目33番1号  
 (72)発明者 津田 洋幸  
 愛知県名古屋市中区和区菊園町2-5-4  
 (72)発明者 飯郷 正明  
 埼玉県北本市中央3-81  
 (72)発明者 富田 守  
 神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業  
 株式会社食品総合研究所内  
 (74)代理人 工藤 力

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 経口がん転移抑制剤

(57)【要約】

【課題】 副作用が少なく、長期間投与することができ、かつ経口的に投与し得るがん転移抑制剤を提供する。

【解決手段】 非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、該加水分解物の薬学的に許容される塩類、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体及び該ペプチド類の薬学的に許容される塩類からなる群より選択される1種又は2種の物質を有効成分として含有する経口がん転移抑制剤。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、該加水分解物の薬学的に許容される塩類、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体及び該ペプチド類の薬学的に許容される塩類からなる群より選択される1種又は2種の物質を有効成分として含有する経口がん転移抑制剤。

【請求項2】 非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、又は該加水分解物の薬学的に許容される塩類が、3～3200mg/日/体重kgの割合で経口的に投与される請求項1に記載の経口がん転移抑制剤。

【請求項3】 ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体、又は該ペプチド類の薬学的に許容される塩類が、0.2～320mg/日/体重kgの割合で経口的に投与される請求項1に記載の経口がん転移抑制剤。

【請求項4】 該ペプチド類が、配列番号1から配列番号31のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する請求項1又は請求項3に記載の経口がん転移抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、経口的に投与し得るがん転移抑制剤に関するものである。更に、詳しくは、本発明は、非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、該加水分解物の薬学的に許容される塩類、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体及び該ペプチド類の薬学的に許容される塩類からなる群より選択される1種又は2種の物質を有効成分として含有する経口がん転移抑制剤、である。

## 【0002】

【従来の技術】がんの診断、治療技術は著しく進歩し、早期に発見されたがんの治癒率は、向上し続けている。しかし、一旦治癒したかに見えたがんが再び他の臓器で増殖する場合が多く、このためがんの臨床における転移抑制の問題は重要性が増加している。転移の概略は、原発巣からのがんの遊離、血管内又はリンパ節への侵入、血流又はリンパ液中での移動、血管内皮、基底膜又はリンパ節への接着、標的臓器での増殖等、多数の過程を経ることが知られており（実験医学、第12巻、第8号、第906～911ページ、1994年）、これらの過程のいずれか、又は全部を阻害することにより、がん細胞の転移を抑制することができる。

【0003】従来、多くの制がん剤が転移抑制の目的にも使用されてきたが、それらの転移抑制効果は明らかでなかった（平成6年度日本癌学会総会記事、第458ペ

2

ージ、1994年）。また、新たに多数の物質が、がん転移抑制を主たる目的として開発され、例えば、細胞外マトリックスに存在する金属プロテアーゼ阻害剤として転移浸潤を抑制できるカルボスチリル誘導体（特開平8-81443号公報）、細胞接着阻害活性を有する事により転移先の細胞にがん細胞の接着を防止するとされるアミノハログノナフトキノン誘導体（特開平8-113555号公報）等が知られている。

【0004】これら種々の生理活性阻害因子は、その薬剤が経口投与であっても、非経口投与であっても、それらの有効量を投与した場合、がん細胞以外の細胞にも同様に作用するため強い副作用が現れ、有効量投与することは、患者のQOL(quality of life)上適切ではなく、そのため満足すべきがん転移抑制剤は経口、非経口を問わず、未だ実用化されていない。

【0005】がんの転移は、乳がん等の原発巣から早期に起こることも多いが、5年後の生存率をもって一応の治癒と解釈されるように、5年後、10年後でも転移して再発する（豊島滋著、「ガン」の再発と転移」、第64ページ、自由国民社、1979年9月10日、及び内科、第49巻、第6号、第1061～1066ページ、1982年）。従って、退院後のがん患者は、がん転移抑制剤を、自宅療養段階において数年から10年以上、継続的に使用するのが普通であり、注射薬等は自宅療養又は社会復帰後の患者が用いるためには、たとえ有効であっても多大な時間を費やして通院することが必要で、多忙な患者にとって実用上使用が困難な薬剤である。このような状況から長年にわたり安心して容易に使用でき、かつ副作用の少ない経口投与薬剤が待望されていたのである。

【0006】天然物質であるドコサヘキサエン酸(DHA)及びその誘導体（特開平8-53351号公報）、シソの葉抽出物（特開平8-73371号公報）等はこのような要望に合致する物質として開発されてきた。これら天然物由来の経口がん転移抑制剤は、一般に副作用は少ないが、効果は不十分であることが多く、また、独特な風味、性状を有し、更に、酸化されやすい等使用上不都合な性状を有する物質である。従って、個人の嗜好性が高く、混合できる食品にも限界があり、多くの患者が、がん転移抑制のため抵抗なく長期的、かつ継続的に用いるのは困難であった。

【0007】一方、ラクトフェリン(lactoferrin)は、乳汁及び唾液、涙、粘膜分泌液等のヒトを含む哺乳動物の体液に存在し、約10%の糖鎖含量を有する分子量8万前後の鉄結合性糖タンパク質であり、天然のラクトフェリンは、通常飽和状態の10～20%の鉄を結合している（以下、非鉄飽和ラクトフェリンをLfと記載することがある）。

【0008】ラクトフェリンは、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害微生物に対して抗菌作用を

3

示すことが知られており〔ジャーナル・オブ・ペディアトリクス(Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年〕、ブドウ球菌及び腸球菌に対して、抗菌作用を有することも知られている〔ジャーナル・オブ・デイルー・サイエンス(Journal of Dairy Science)、第67巻、第606ページ、1984年〕。

【0009】本発明者らは、ラクトフェリンの抗菌性に着目し、哺乳類のラクトフェリン、アボラクトフェリン、及び金属飽和又は部分飽和ラクトフェリン(以下、これらをまとめてLf類と記載することがある)の酸又は酵素による加水分解物が、望ましくない副作用(例えば、抗原性等)等がなく、しかも未分解のそれらよりも強い耐熱性及び抗菌性を有することを見出し、既に特許出願を行った(特開平5-320068号公報、ヨーロッパ特許公開第438750号)。

【0010】また、本発明者らは、Lf類の加水分解物から強い抗菌活性を有するペプチドを単離し、それらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有するペプチド及びそれらのペプチドの誘導体を合成し、20個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-92994号公報)、11個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド

(特開平5-78392号公報)、6個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-148297号公報)、5個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-1498296号公報)、3~6個のアミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド(特開平5-148295号公報)を発明し、それぞれ既に特許出願した。

【0011】更に、本発明者らは、Lf類の加水分解物と同一のアミノ酸配列を有するペプチド又はこれらペプチドの誘導体に脳の保護作用(特開平6-172200号公報)、上皮細胞増殖因子による繊維芽細胞増殖を促進する作用(特開平6-48955号公報)及び神経成長因子産生促進作用(特開平5-23557号公報)があることを見出し、それぞれ既に特許出願した。

【0012】疾病の治療剤にラクトフェリンを応用した例として、抗リウマチ剤(特開平5-186368号公報)が知られており、ラクトフェリンの加水分解物については、チロシナーゼ活性阻害(ヨーロッパ特許公開第438750号)、細胞への病原菌付着防止(特開平3-220130号公報)、抗ウイルス作用(特開平1-233226号公報)等が知られている。

【0013】ラクトフェリンを抗がん剤として使用することも検討され、例えば、鉄飽和ラクトフェリンは抗腫瘍効果を有することが知られている(特公平5-86932号公報)。本発明者らは、ラクトフェリンを酸又は酵素により加水分解した物質と同一のアミノ酸配列を有するペプチド又はこれらペプチドの誘導体が非経口抗腫瘍作用を有することを発見し、特許出願した(特開平7-309771号公報)。

【0014】がん転移抑制についても、いくつかの検討

4

がなされ、ラクトフェリンは、非経口投与により抗がん転移活性を有するとの研究結果が、腫瘍細胞をマウスの静脈内に注射し、ラクトフェリンは腹腔内に投与するという特異な条件で報告されている〔キャンサー・リサーチ(Cancer Research)、第54巻、第2310~2312ページ、1994年〕。更に、ラクトフェリン及びラクトフェリンのアミノ酸配列中の特定な25個アミノ酸からなるペプチドが、非経口投与によるがん転移抑制活性を有することが発表されている(農芸化学会誌、第69巻、臨時増刊号、第143ページ、1995年)。

【0015】このように、いくつかの研究にもかかわらず、ラクトフェリン、ラクトフェリン加水分解物又は特定のアミノ酸配列を有するラクトフェリン由来のペプチド等が経口投与により、がん転移抑制活性を有するか否かについては、従来検討がなされていなかった。その理由は、ラクトフェリンが経口投与された場合、消化酵素の働きにより容易に分解されるため、生理活性、特にがん転移抑制活性のような高度な生理作用を示すはずがないと言う、タンパク質化学の一般的常識のためである。

【0016】更に、ラクトフェリン加水分解物、ラクトフェリン由来のペプチドは、加水分解前のタンパク質以上に消化酵素によって分解されやすいことから、ラクトフェリンと同様に経口投与によるがん転移抑制活性に関しては何等検討がされていなかったのである。

【0017】以上のとおり、長期使用でき、副作用が少ない経口がん転移抑制剤が待望されていたが、未だに優れた物質は、知られていないのが現実であり、またラクトフェリン、ラクトフェリンの加水分解物、ラクトフェリン由来のペプチドが経口投与によりがん転移抑制作用を有することは発表されておらず、文献にも記載されていない。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、副作用が少なく、長期間投与することができ、かつ経口的に投与し得るがん転移抑制剤を検索していたが、意外にも消化酵素による分解が避けられないとされているLfに経口がん転移抑制効果があることを見出した。これを研究する過程で、更に意外な現象として、Lf以上に消化酵素による分解を受けやすいと考えられるラクトフェリン類の加水分解物及びラクトフェリン類由来のペプチドに、経口投与によるがん転移抑制効果があることを見出し、有効性の確認試験を重ねて、本発明を完成した。

【0019】本発明は、以上の従来技術に鑑みてなされたものであり、副作用が少なく、長期間投与することができ、かつ経口的に投与し得るがん転移抑制剤を提供することを目的としている。

【0020】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決する本発明は、非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、

5

該加水分解物の薬学的に許容される塩類、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体及び該ペプチド類の薬学的に許容される塩類からなる群より選択される1種又は2種の物質を有効成分として含有する経口がん転移抑制剤、である。

【0021】また、本発明は、非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、又は該加水分解物の薬学的に許容される塩類が、3～3200mg/日/体重kgの割合で経口的に投与されること、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体、又は該ペプチド類の薬学的に許容される塩類が、0.2～320mg/日/体重kgの割合で経口的に投与されること、及び該ペプチド類が、配列番号1から配列番号31のいずれかに記載のアミノ酸配列を有することを望ましい態様としてもいる。

【0022】次に、本発明について詳述する。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明の経口がん転移抑制剤の有効成分の一つであるLfは、市販品又は哺乳動物の乳から常法により分離されたものであり、生産量が多いことから、牛乳から分離されたものが望ましい。

【0024】Lfの分離、精製の一例を示せば、次のとおりである。CM-セファロースFF（ファルマシア社製）をカラムに充填し、塩酸を通液し、水洗し、イオン交換体を平衡化し、4℃に冷却したpH6.9の脱脂乳をカラムに通液し、透過液を回収し、再度同様にカラムに通液する。次いで、蒸留水をカラムに通液し、食塩水を通液し、イオン交換体に吸着した塩基性蛋白質溶出液を得る。

【0025】この溶出液に飽和度80%で硫酸アンモニウムを添加し、蛋白質を沈殿させ、遠心分離して沈殿を回収し、飽和度80%の硫酸アンモニウム溶液で洗浄し、脱イオン水を添加して溶解し、得られた溶液を限外濾過膜モジュール（例えば、旭化成社製のSLP0053）を用いて限外濾過し、のち水を添加し、同装置を用いてダイアフィルトレーションを行い、脱塩し、凍結乾燥し、粉末状ウシ・ラクトフェリンを得る。

【0026】以上の方法により得られたLfの純度を、電気泳動法により測定した結果、95%（重量。以下、分解率を除き、特に断りのない限り同じ）以上の純度を有している。尚、凍結乾燥前の各精製工程におけるラクトフェリン含有液を、本発明に使用できることは、いうまでもない。

【0027】また、ヒトのLfは、大量に製造することはできないが、組換えDNA技術により得られる組換え真菌、組換え乳牛（トランスジェニック・カウ）等により生産されるヒトのLfであっても本発明に使用することができる。

6

【0028】Lfの有効投与量は、動物試験の結果から積算して3～3200mg/日/体重kgの範囲である。

【0029】本発明の経口がん転移抑制剤の他の有効成分であるラクトフェリンの分解物又はペプチドをラクトフェリンから製造する場合、出発物質として使用するラクトフェリンは、市販のラクトフェリン、哺乳類（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等）の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、又はこれらの乳の処理物である脱脂乳、ホエー等から常法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー等）により分離したLf、それらを塩酸、クエン酸等により脱鉄したアポラクトフェリン、アポラクトフェリンを鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属でキレートした金属飽和又は部分飽和ラクトフェリン（以下、これらをまとめてLf類と記載することがある）であり、市販品又は公知の方法により製造した調製品を使用することもできる。

【0030】Lf類を、酸又は酵素を用いて加水分解する。酸による加水分解は、Lfを0.1～20%、望ましくは5～15%、の濃度で水又は精製水に溶解し、得られた溶液に塩酸、リン酸等の無機酸、又はクエン酸等の有機酸を添加し、溶液のpHを1～4、望ましくは2～3、に調整し、調整したpHにより適当な温度で所定時間加熱し、加水分解する。例えば、pH1～2に調整した場合は、80～130℃、望ましくは90～120℃、pH2～4に調整した場合は、100～130℃、望ましくは100～120℃、でそれぞれ1～120分間、望ましくは5～60分間、加熱する。

【0031】酵素による加水分解は、Lfを0.5～20%、望ましくは5～15%、の濃度で水又は精製水に溶解し、溶液のpHを使用する酵素の至適pHに調整し、15～55℃、望ましくは30～50℃、の温度に加温し、30～600分間、望ましくは60～300分間、保持して加水分解し、酵素反応液をそのまま、又は中和し、加熱して酵素を失活する。

【0032】使用する酵素は、特に制限がなく、市販の酵素、例えば、モルシン（商標。盛進製薬社製。至適pH2.5～3.0）、ブタペプシン（和光純薬工業社製。至適pH2～3）、スミチームAP（商標。新日本化学社製。至適pH3.0）、アマノM（商標。アマノ社製。至適pH7.0）、トリプシン（ノボ社製。至適pH8.0）等を単用又は任意に併用する。

【0033】使用する酵素の量は、基質に対して0.1～5.0%の範囲、特に望ましくは0.5～3.0%、である。

【0034】加水分解の分解率は、次の方法により測定し、4～50%、望ましくは6～40%、である。即ち、分解率は、ケルダール法により測定した全窒素量に対するホルモール滴定法により測定したホルモール態窒素量から式

7

分解率(%) = (ホルモル態窒素量/全窒素量) × 100

により算出した値である。

【0035】Lf類加水分解物の有効投与量は、動物試験の結果から積算して3〜3200mg/日/体重kgの範囲である。

【0036】また、本発明のがん転移抑制剤の他の有効成分であるLf類由来のペプチドは、前記Lf類の加水分解物から公知の分離手段によって単離されるペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列若しくは相異なるアミノ酸配列を有するペプチド、これらのペプチドの薬学的に許容される誘導体、これらのペプチドの薬学的に許容される塩類、これらのペプチドと同一若しくは相異なるアミノ酸配列を有する化学的に合成されたペプチド、又はこれらの任意の混合物（以下、これらをペプチド類と記載することがある）である。

【0037】例えば、前記Lf類加水分解物の濾液を水酸化ナトリウム溶液で中和し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、遠心分離し、透明な上清を得る。この上清を逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.05% TFA（トリフルオロ酢酸）を含む20〜60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、27〜30%のアセトニトリル含量の画分を分別し、この画分を真空乾燥し、Lf類由来のペプチド類が得られる。

【0038】また、ペプチド自動合成装置（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製。LKBBiolynx 4170）を用い、シェパード等による固相ペプチド合成法〔ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー。パーキン・トランザクション1：オーガニック・アンド・バイオーガニック・ケミストリー（Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1: Organic and Bio-Organic Chemistry）、第538頁、1981年〕に基づいて次のとおりペプチドを合成することもできる。

【0039】アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸〔以下Fmoc-アミノ酸又はFmoc-固有のアミノ酸の名称（例えば、Fmoc-アスパラギン）と記載することがある〕に、N、N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いる。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のアミノ酸残基に相当するFmoc-アミノ酸無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンを触媒としてウルトロシンA樹脂（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のちアミノ酸配列のC-末端から2番目に相当するFmoc-アミノ酸無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定され

8

たアミノ酸の脱保護アミン官能基にカップリングさせる。以下同様にして順次アミノ酸を固定する。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、94% TFA、5% フェノール、及び1% エタジオールからなる溶媒で保護基の除去及びペプチドの脱離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を濃縮し乾燥すれば、合成によりLf類由来のペプチド類が得られる。

【0040】更に、これらのペプチド類と同一のアミノ酸配列若しくは相異なるアミノ酸配列を有するペプチド類、これらのペプチド類の誘導体、これらのペプチド類の薬学的に許容される塩類又はこれらの任意の混合物は、例えば、前記特開平5-92994号公報、特開平5-78392号公報、特開平5-148297号公報、特開平5-1498296号公報及び特開平5-148295号公報の各発明に記載された方法によって得ることができる。

【0041】Lf類由来のペプチド類の有効投与量は、動物試験の結果から積算して0.2〜320mg/日/体重kgの範囲である。

【0042】前記の方法によって得られるペプチド類としては、次のアミノ酸配列を有するペプチド類、その誘導体又は塩類を望ましい態様として例示することができる。例えば、配列番号1、2及び27のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類又はその誘導体（特開平5-78392号公報）、配列番号3、4、5及び6のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類又はその誘導体（特開平5-148297号公報）、配列番号7、8、9及び31のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類又はその誘導体（特開平5-1498296号公報）、配列番号10乃至21のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類又はその誘導体（特開平5-148295号公報）、配列番号22から26、28、29及び30のアミノ酸配列を有するペプチド、その塩類又はその誘導体（特開平5-92994号公報）である。

【0043】前記ペプチド類の薬学的に許容される塩類としては、塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の酸付加塩を例示でき、誘導体としては、カルボキシル基をアミド化又はアシル化した誘導体を例示することができる。

【0044】前記のとおり得られたLf、Lf類の加水分解物、Lf類由来のペプチド類を、常法により糖衣錠、タブレット、カプセル等の経口投与剤、栄養剤に配合して経腸投与剤、飲料又はゼリー等の食品、又は飼料として使用することができる。

【0045】次に試験例を示して本発明を、更に詳述する。

【0046】試験例1

この試験は、Lf及びLf類由来ペプチドの経口がん転

9

移抑制効果を調べるために行った。

【0047】1) 試験試料、試験動物及び腫瘍細胞株

#### ①試験試料

市販のLf粉末(森永乳業社製)及び参考例2と同一の方法により、前記Lf粉末から調製したLf由来ペプチドを使用した。

【0048】②試験動物

6週齢のCDF1マウス90匹(日本チャールスリバー社から購入)を、無作為に9群(1群10匹)に分けて使用した。

【0049】③腫瘍細胞

フィドラーらの方法[ネイチャー(Nature)、第242巻、第148~149ページ、1973年]を一部改良し、次のとおり調製した。マウス大腸がんコロネ26細胞(以下C<sub>o</sub>26細胞と記載することがある。財団法人癌研究会癌研究所、癌化学療法センターより入手)1×10<sup>5</sup>個/マウスを、6週令Balb/cマウス(日本チャールスリバー社から購入)3匹に尾静脈注射し、約3週間後に生成した肺転移腫瘍を取り出してすりつぶし、遊離した細胞の同数を再び同系統マウス3匹の尾静脈に注射する。これを数回反復して、自然に肺に転移する高転移細胞系C<sub>o</sub>26Luを選別し、本試験に使用した。尚、C<sub>o</sub>26Luは、皮下移植後約14日で転移することが判明した。

【0050】2) 試験方法

9群90匹全てのCDF1マウスの背中皮下に1×10<sup>5</sup>個のC<sub>o</sub>26Lu細胞を移植した(0日目)。各群のマウスに5~9日目、12~16日目及び19~21日目まで300~1000mg/日/kg体重のLf又は30~100mg/日/kg体重のLf由来ペプチドを1日1回経口投与し、対照群には何も投与しなかった。

【0051】22日目に肺を摘出し、アセトンで固定し、目視により肺転移巣の数を計数し、肺への転移の抑制効果を試験した。

【0052】尚、Lf投与群中1群には150mg/日/kg体重を1日2回(表1において150×2と表示)、ペプチド投与群中1群には15mg/日/kg体重を1日2回(表1において15×2と表示)投与した。

【0053】3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。表1から明らかとなっており、Lf及びLf由来のペプチド投与群は、投与量に応じて転移数はほぼ半減し、これらの物質のがん転移抑制効果が明らかに認められた。更に、詳しくは、Lf投与群では300mg/日/kg体重の投与量であっても、これを1日2回に分割して投与した群が、より有効であり、一方Lf由来ペプチド投与群では2回に分割して投与する意義は認められなかった。

【0054】また一般の転移抑制剤では、その毒性のため移植した腫瘍の縮小が観察されるが、本試験では移植

10

腫瘍の大きさは、対照群とLf及びLf由来ペプチド投与群との間で差がなく、これらの毒性が低いことが推定された。更に、各臓器の顕微鏡観察によっても、肝臓等他の臓器への転移は認められなかった。

【0055】以上の結果から、Lf及びLf由来のペプチドは、経口がん転移抑制効果があることが明らかであった。尚、他のペプチド類についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0056】

10 【表1】

試験群	投与量 (mg/日/kg体重)	転移数	
		中央値	範囲
対照群	0	56.0	34~95
Lf群	1000	28.0	20~44
	300	37.0	5~53
	100	44.5	10~67
	150×2	27.5	21~111
ペプチド群	100	31.0	6~49
	30	36.5	12~86
	10	47.5	35~71
	15×2	38.0	21~65

【0057】試験例2

この試験は、Lf、Lf加水分解物、及びLf類由来ペプチド類の経口がん転移抑制効果を調べるために行った。

【0058】1) 試験試料、試験動物及び腫瘍細胞株

#### ①試験試料

市販のLf粉末(森永乳業社製。第1群に投与)、参考例1と同一の方法によりこのLf粉末から調製したLf加水分解物(第2群に投与)、参考例2と同一の方法によりこの加水分解物から調製したLf由来ペプチド(第3群に投与)、及び参考例3と同一の方法により化学的に合成したLf類由来ペプチド(有機合成ペプチド。第4群に投与)を使用した。尚、対照としてウシ血清アルブミン(シグマ社製のフラクションV。対照群に投与)を使用した。

【0059】②試験動物

6週齢のCDF1マウス20匹(日本チャールスリバー社から購入)を、無作為に4群(1群5匹)に分けて使用した。

【0060】③腫瘍細胞

試験例1で調製した肺への高転移細胞系C<sub>o</sub>26Luを使用した。

【0061】2) 試験方法

C<sub>o</sub>26Lu細胞を移植後、各群に5日目から27日目まで毎日1回、表2に示す投与量により投与したこと、及び28日目に肺を摘出したことを除き、試験例1と同一の方法により試験した。

【0062】3) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から



11

明らかとなり、第1群乃至第4群はいずれも、対照群と比較して転移数が少なく、これらの投与によるがん転移抑制効果が認められた。尚、他のLf、Lf類加水分解物、及びLf類由来ペプチド類についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0063】

【表2】

試験群	投 与 量 (mg/日/kg体重)	転 移 数 (中央値)
対照群	300	62
第1群	300	40
第2群	300	43
第3群	30	38
第4群	30	36

【0064】試験例3

この試験は、Lf類加水分解物の急性毒性を調べるために行った。

【0065】1) 使用動物

6週齢のCD(SD)系のラット(日本SLCから購入)の両性20匹を用い、雄及び雌を無作為にそれぞれ4群(1群5匹)に分けて使用した。

【0066】2) 試験方法

参考例1と同一の方法により製造したLf加水分解物を、注射用水(大塚製薬社製)に溶解し、4ml/100g体重の割合で金属製玉付き針を用いて単回強制経口投与し、急性毒性を試験した。投与量は1000、2000及び4000mg/kg体重であった。

【0067】3) 試験結果

この試験の結果は、表3に示すとおりである。表3から明らかとなり、この加水分解物を1000mg/kg体重及び2000mg/kg体重の割合で投与した群に死亡例は認められなかった。従って、この加水分解物のLD<sub>50</sub>は、2000mg/kg体重以上であり、毒性は極めて低いことが判明した。尚、他のLf加水分解物及びLf類由来のペプチド類についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0068】

【表3】

用 量 (mg/kg)	死 亡 数 / 例 数	
	雄	雌
0	0/5	0/5
1000	0/5	0/5
2000	0/5	0/5
4000	4/5	3/5

【0069】試験例4

この試験は、ペプチド類の急性毒性を調べるために行った。

【0070】1) 使用動物

6週齢のCD(SD)系のラット(日本SLCから購入)の両性35匹を用い、雄及び雌を無作為にそれぞれ7群(1群5匹)に分けて使用した。

12

【0071】2) 試験方法

参考例2と同一の方法で製造したLf由来のペプチド(加水分解物より精製したペプチド)及び参考例3と同一の方法により製造したペプチド(有機合成によるペプチド)を、注射用水(大塚製薬社製)に溶解し、4ml/100g体重の割合で金属製玉付き針を用いて単回強制経口投与し、急性毒性を試験した。投与量は1000、2000及び4000mg/kg体重であった。

【0072】3) 試験結果

この試験の結果は、表4に示すとおりである。表4から明らかとなり、いずれのペプチドを投与した場合も1000mg/kg体重及び2000mg/kg体重の割合で投与した群に死亡例は認められなかった。従って、これらのペプチドのLD<sub>50</sub>は、2000mg/kg体重以上であり、毒性は極めて低いことが判明した。尚、他のペプチド類についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0073】

【表4】

投 与 物 質	用 量 (mg/kg)	死 亡 数 / 例 数	
		雄	雌
無 投 与	0	0/5	0/5
加 水 分 解 物 由 来 の ペ プ チ ド	1000	0/5	0/5
	2000	0/5	0/5
	4000	4/5	4/5
有 機 合 成 に よ る ペ プ チ ド	1000	0/5	0/5
	2000	0/5	0/5
	4000	5/5	5/5

30 【0074】参考例1(Lf加水分解物の調製)

ウシのLfを使用して加水分解物を、次の方法により調製した。

【0075】市販されているウシのLf(ミライ社製)500gを、精製水9.5lに溶解し、得られた溶液に塩酸を添加してpHを3.0に調整し、のち市販の豚ペプシン(和光純薬工業社製)を10g添加し、37℃で6時間加水分解した。次に6規定の水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、セライト濾過し、濾液を凍結乾燥し、粉末状のLf加水分解物約470gを得た。得られた加水分解物の分解率を前記と同一の方法により測定した結果、30%であった。

40

【0076】参考例2(ペプチド類の調製)

市販されているウシのLf(シグマ社製)50mgを精製水0.9mlに溶解し、0.1規定の塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販のブタペプシン(シグマ社製)1mgを添加し、37℃で6時間加水分解した。次いで0.1規定の水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpmで30分間遠心分離し、

50

13

透明な上清を得た。この上清100 $\mu$ lをTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFA(トリフルオロ酢酸)を含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、24~25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%(W/V)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーに

かけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24~32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、33.5~35.5分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥し、ペプチドを得た。

【0077】前記のペプチドを6N塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。同一の試料を気相シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて25回のエドマン分解を行ない、25個のアミノ酸残基の配列を決定した。またDTNB[5, 5-ジチオビス(2-ニトロベンゾイック・アシド)]を用いたジスルフィド結合分析法[アナリティカル・バイオケミストリー(A analytical Biochemistry)、第67巻、第493頁、1975年]によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0078】その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、3番目と20番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、3番目のシステイン残基からN-末端側に2個のアミノ酸残基が、20番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸がそれぞれ結合した、配列番号26に記載のアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0079】参考例3(ペプチド類の有機合成)  
ペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製。LKB Biolyne 4170)を用い、シェパード等による固相ペプチド合成法[ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー。パーキン・トランザクション1:オーガニック・アンド・バイオーオーガニック・ケミストリー(Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1:Organic and Bio-Organic Chemistry)、第538頁、1981年]により、ペプチドを次のとおり合成した。

【0080】アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸に、N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いた。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のアスパラギン残基に相当するFmoc-アスパラギン無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンに触媒

14

としてウルトロシンA樹脂(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のちアミノ酸配列のC-末端から2番目に相当するFmoc-アルギニン(Pmc:2, 2, 5, 7, 8-Pentamethyl-chroman-6-sulphonyl基)無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定されたアスパラギンの脱保護アミン官能基にカップリングさせた。以下同様にして順次グルタミン、トリプトファン、グルタミン、及びフェニルアラニンを固定した。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、94%TFA、5%フェノール、及び1%エタジオールからなる溶媒で保護基の除去及びペプチドの脱離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を濃縮し、乾燥し、ペプチド粉末を得た。

【0081】前記のペプチドについてアミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析し、次に参考例2と同一のシーケンサーにより配列を決定したところ、配列番号10に記載のアミノ酸配列を有することを確認した。

【0082】参考例4(アポラクトフェリンの調製)  
脱脂乳から調製した市販のウシLf粉末(ドモ社製)1kgを精製水20lに溶解し、透析チューブ(三光純薬社製。1-7/8)に入れ、400lの0.1Mクエン酸溶液(pH2.2)に対して4℃で36時間透析し、更にクエン酸を除去するため、400lの脱イオン水に対して、4℃で24時間透析し(2回脱イオン水を交換)、透析内液を、遠心分離して固形物を除去し、凍結乾燥し、粉末状のアポラクトフェリン約950gを得た。得られたアポラクトフェリンを分光光度計(日立製作所製。2000U)を用い、450nmの吸光度により、鉄の飽和度を測定した結果、飽和度は0%であった。

【0083】参考例5(アポラクトフェリン加水分解物の調製)

参考例4のウシアポラクトフェリンを使用して加水分解物を、次の方法により調製した。アポラクトフェリン500gを、精製水9.5lに溶解し、得られた溶液に1M塩酸を添加してpHを2.0に調整し、120℃で15分間加熱し、冷却して加水分解物を得た。次に、6M水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、セライト濾過し、濾液を凍結乾燥し、粉末状のアポラクトフェリン加水分解物約400gを得た。この加水分解物の分解度は、9%であった。

【0084】参考例6(アポラクトフェリン由来ペプチド類の調製)

参考例5のウシアポラクトフェリン加水分解物50mgを、精製水0.9mlに溶解し、以下参考例2と同一の方法で精製した。精製の最後のTSKゲルODS-12

15

OT (東ソー社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーでは35.5~37.5分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥し、アボラクトフェリン由来のペプチドを得た。

【0085】前記のペプチドを参考例2と同一の方法で加水分解し、アミノ酸組成を分析し、アミノ酸配列を決定し、更にDTNBを用いたジスルフィド結合分析法によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0086】その結果、このペプチドは、32個のアミノ酸残基からなり、10番目と27番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、10番目のシステイン残基からN-末端側に9個のアミノ酸残基が、27番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸がそれぞれ結合した、配列番号29に記載のアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0087】次に実施例を示して本発明を、更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものでない。

【0088】

【実施例】

実施例1 (Lfを含有する動物用粉末飼料の調製)

ウシのLf (ミライ社製) 60g及びMF粉末飼料 (オリエンタル酵母社製) 3kgを粉末混合機 (関東混合機社製。SS機種、型式No. 151) で30分間混合し、500gずつポリエチレン製の袋に分包し、2%Lf含有飼料を得た。尚、この飼料を冷蔵庫内に保存した。

【0089】実施例2 (Lfを配合した経腸栄養剤の調製)

粉末状ウシのLf (ミライ社製) 2g及び市販の経腸栄養剤 (エーザイ社製。クリニミール) 1包 (89g) に50~60℃の温湯100mlを添加し、泡立て器で均一に混合し、更に温湯240mlを添加して完全に溶解し、これを1日数回分に分けて投与した。

【0090】実施例3 (Lfを添加した飲料の調製)

脱脂粉乳 (森永乳業社製) 90gを、50℃の温湯800mlに溶解し、砂糖 (日新精糖社製) 30g、インスタントコーヒー粉末 (ネスレ社製) 14g、カラメル (昭和化工社製) 2g及びコーヒーフレーバー (三栄化学社製) 0.01g、を攪拌しながら順次添加して溶解し、10℃に冷却し、ウシのLf (森永乳業社製) 1gを水75mlに溶解した液を添加し、Lf0.1%を含む乳飲料を調製した。

【0091】実施例4 (Lf散剤の調製)

予め6号ふるい (井内盛栄堂社製) で篩分けした市販のウシのLf粉末 (ミライ社製) 10g及び乳糖 (森永乳業社製) 50gを乳鉢中で混和し、これに予め5号ふるい (井内盛栄堂社製) で篩分けした乳糖40gを添加して混和し、全量を再度5号ふるいで篩分けし、1包5gずつ分包機 (東京商会。OMP-90A) で分包し、1

16

0%Lf散剤を得た。尚、この散剤を冷暗所に保存した。

【0092】実施例5 (Lf配合レアチーズケーキの調製)

①ビスケット (森永製菓社製) 8枚計約160gを細切し、加温して溶融したバター (森永乳業社製) 30gと混合した。

【0093】②18cmの丸底の容器に敷き詰め、軽く押し固める。

【0094】③粉末ゼラチン (マルハ社製) 5gを水30mlに膨潤させ、加温して溶解した。

【0095】④ウシのLf (ミライ社製) 10gを50℃に加温した牛乳 (森永乳業社製) 60mlに溶解した。

【0096】⑤クリームチーズ (森永乳業社製) 250gを、加温して軟化し、クリーム状となし、グラニュー糖 (三井精糖社製) 50gを添加して混練した。

【0097】⑥⑤に③のゼラチン液、④の牛乳、レモン汁1/2個分、を添加して混合し、冷却した。

20 【0098】⑦生クリーム (森永乳業社製) 60mlを泡立てて⑥に添加し、②の容器に充填し、冷蔵庫で冷却して固化した。

【0099】実施例6 (Lf錠剤の調製)

約1lの乳鉢 (中島製作所製) に結晶セルロース (和光純薬工業社製) 20gを取り、水20mlを添加して混和し、次いで予め48メッシュのふるい (和科盛社製) で篩分けした乳糖 (森永乳業社製) 25g及びウシのLf (森永乳業社製) 55gを添加して混和した。得られた湿塊をステンレス製20メッシュふるい (和科盛社製) 上に取り、乾燥用ステンレス板2枚の上に手で押し出して顆粒を形成し、手早く均等に分布させ、乾燥機に入れ、25℃で2日間乾燥し、微細な顆粒を得た。

【0100】乾燥した顆粒を、ポリエチレン製20メッシュふるいで篩分けし、ふるいを通過した顆粒を、広い紙上に広げ、予め48メッシュで篩分けしたステアリン酸マグネシウム (関東化学社製) 2gを添加し、手で混ぜて均質にした。これを打錠機 (木村製作所製。KT-2型) により直径8mmのR杵を使用して、打錠数を10、錠剤重量を0.62g及びモンサント硬度3.5~5.0kgの圧縮圧力を設定して打錠し、50%Lf含有剤を得た。この錠剤を遮光したデシケーター (日本理化学機器社製。NRT-90B) 中に保存した。

【0101】実施例7 (カプセル入りLf加水分解物の調製)

乳糖 (和光純薬社製) 60g、トウモロコシデンプン (日清製粉社製) 40g、結晶セルロース (和光純薬社製) 40g及び参考例1と同一の方法により調製したウシLf加水分解物60gを50メッシュふるい (ヤマト科学社製) により篩分けし、厚さ0.5mmのポリエチレン製の袋にとり、転倒混合し、全自動カプセル充填機

17

(Cesere Pedini 社製。プレス式)を用い、前記粉末をカプセル(日本エランコ社製。1号ゼラチンカプセル、Op. Yellow No.6 Body、空重量は75mg)に内容量275mgで充填し、ウシLf加水分解物82mg入りのカプセル剤を得た。尚、このカプセル剤を室温で保存した。

【0102】実施例8(Lf加水分解物を含有する固形飼料の調製)

参考例1と同一の方法により調製したウシのLf加水分解物

実施例9(Lf加水分解物由来ペプチドを含有する錠剤)

Lf加水分解物から得られたペプチド

(参考例2と同一の方法により製造)

	50 (mg)
結晶セルロース	170
コーンスターチ	66
タルク	11
ステアリン酸マグネシウム	3

1錠当り前記の割合の各原料を常法により均一に混合し、造粒し、乾燥し、打錠し、17%のペプチドを含有する錠剤を得た。なお、Lf類加水分解物から得られたペプチド以外の原料はいずれも市販品を用いた。

実施例10(Lf類加水分解物由来ペプチドを配合したババロアの調製)

板ゼラチン(マルハ社製)3枚約9gを水で膨潤させ、チョコレート(森永製菓社製。製菓用)30gを、細切して湯せんにつけて溶解した。これとは別にボールに卵黄3個分を入れ、砂糖(三井精糖社製)70gを添加し、白みを帯びるまで泡立て器で攪拌し、これに前記溶解チョコレートを追加し、更に攪拌して混合し、50℃に加温した牛乳(森永乳業社製)220mlを徐々に添

実施例11(Lf由来有機合成ペプチドを含有する散剤)

Lf類由来の有機合成ペプチド

(参考例3と同様の方法により製造)

	50 (mg)
結晶セルロース	375
コーンスターチ	575

1袋当り前記各材料を均一に混合し、常法により散剤15袋を調製した。尚、有機合成ペプチド以外の原料はい

解物粉末5g及び固形げっ歯類用飼料(船橋農場社製。F2)1.5kgを厚さ0.2mmの透明ポリエチレン製袋に入れ、開口部をポリエチレン製のひもで閉鎖し、手で上下左右に約10分間振盪し、粉末を固形試料の微細な穴に入り込ませると同時に均一に混合し、のち200gずつポリ袋に分包し、0.33%Lf加水分解物含有固形飼料を得た。尚、この飼料を冷暗所に保存した。

【0103】

加し、鍋に移し替えて弱火にかけ、絶えず攪拌しながら加熱し、のち火を止めて膨潤させたゼラチンを添加し、攪拌しながら溶解し、ステンレス製こし器で濾過し、氷水中で冷却し、約50℃に冷却したとき30mlの牛乳に懸濁したウシのLf由来ペプチド(参考例2と同一の方法により調製)1gを添加し、攪拌して混合した。

【0104】一方、生クリーム(森永乳業社製。脂肪分45%ホイップクリーム)100mlをボールに入れ、泡立て器で泡立て、これを前記の混合液に流し入れ、手早く混合してステンレスの型に流し入れ、冷蔵庫内で固化し、チョコレートババロアを得た。

【0105】

ずれも市販品を用いた。

【0106】

実施例12(有機合成ペプチドを含有するカプセル剤)

Lf類由来の有機合成ペプチド

(参考例3と同一の方法により製造)

	10 (mg)
乳糖	120
結晶セルロース	42
カルボキシメチルセルロース	10
タルク	15
ステアリン酸マグネシウム	3

1錠当り前記の割合の各原料を、常法により均一に混合し、カプセル充填機を用いてカプセル剤を調製した。尚、有機合成ペプチド以外の原料はいずれも市販品を用いた。

【0107】実施例13(Lf類加水分解物を含有する固形飼料の調製)

参考例6と同一の方法により調製したウシのアボラクトフェリン加水分解物の粉末5gを用い、実施例8と同一の方法により、0.33%アボラクトフェリン加水分解物含有固形飼料を得た。尚、この飼料を冷暗所に保存した。

【0108】

## 実施例14 (アボラクトフェリン加水分解物由来ペプチドを含有する錠剤)

アボラクトフェリン加水分解物から得られたペプチド

(参考例6と同一の方法により製造)

	50 (mg)
結晶セルロース	170
コーンスターチ	66
タルク	11
ステアリン酸マグネシウム	3

1錠당前記の割合の各原料を常法により均一に混合し、造粒し、乾燥し、打錠し、17%のペプチドを含有する錠剤を得た。尚、アボラクトフェリン加水分解物から得られたペプチド以外の原料はいずれも市販品を用いた。

## 【0109】

【発明の効果】以上詳記したとおり、本発明は、非鉄飽和ラクトフェリン、ラクトフェリン類の加水分解物、該加水分解物の薬学的に許容される誘導体、該加水分解物の薬学的に許容される塩類、ラクトフェリン類の加水分解物由来のペプチド類、該ペプチド類の薬学的に許容される誘導体及び該ペプチド類の薬学的に許容される塩類からなる群より選択される1種又は2種の物質を有効成分として含有する経口がん転移抑制剤であり、本発明によって、奏せられる効果は次のとおりである。

(1) 本発明のがん転移抑制剤は、食品、医薬品等として経口的に容易に摂取してがんの転移を抑制できる。

(2) 本発明のがん転移抑制剤は、食品である乳に由来する蛋白質であるLf、Lf類の加水分解物又はLf類に由来するペプチド類を有効成分としているので、長期間使用しても副作用がなく、安全である。

## 【0110】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Lys Lys  
1 5 10

## 【0111】配列番号: 2

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Gln R01 R01 Met Arg Lys

1 5 10

## 【0112】配列番号: 3

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Arg R01 R01 R01 R01 Arg  
1 5

## 20 【0113】配列番号: 4

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Lys R01 R01 R01 R01 Arg  
1 5

## 30 【0114】配列番号: 5

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

40 Lys R01 R01 R01 R01 Lys  
1 5

## 【0115】配列番号: 6

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

50 配列:

21

Arg R01 R01 R01 Lys

1 5

【0116】配列番号: 7

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01 はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Arg R01 R01 R01 Arg

1 5

【0117】配列番号: 8

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01 はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Lys R01 R01 R01 Arg

1 5

【0118】配列番号: 9

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、R01 はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

配列:

Arg R01 R01 R01 Lys

1 5

【0119】配列番号: 10

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn

1 5

【0120】配列番号: 11

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

22

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg

1 5

【0121】配列番号: 12

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

10 配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Gln Trp Gln Arg

1

【0122】配列番号: 13

配列の長さ: 3 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

20 配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Trp Gln Arg

1

【0123】配列番号: 14

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

30 配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Arg Arg Trp Gln Trp

1 5

【0124】配列番号: 15

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

40 配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Arg Arg Trp Gln

1

【0125】配列番号: 16

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

50 配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

23

トとして含むペプチド。

配列:

Trp Gln Trp Arg

1

【0126】配列番号: 17

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。 10

配列:

Gln Trp Arg

1

【0127】配列番号: 18

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。 20

配列:

Leu Arg Trp Gln Asn Asp

1

5

【0128】配列番号: 19

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。 30

配列:

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Ile Thr Cys Val

20

【0132】配列番号: 23

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Lys Cys\* Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Ile Thr Cys\* Val

20

【0133】配列番号: 24

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

24

配列:

Leu Arg Trp Gln Asn

1

5

【0129】配列番号: 20

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Leu Arg Trp Gln

1

【0130】配列番号: 21

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Arg Trp Gln

1

【0131】配列番号: 22

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、2番のCysと19番のCysがジスルフィド結合している。

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列においてCys\*は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、2番のCysと19番のCysがジスルフィド結合している。

配列:

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Val Ser Cys Ile  
 20

【0134】配列番号: 25

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列においてCys\*は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

配列:

Lys Cys\* Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Val Ser Cys\* Ile  
 20

【0135】配列番号: 26

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、3番のCysと20番のCysがジスルフィド結合している。

配列:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe  
 20 25

【0136】配列番号: 27

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

配列:

Lys Thr Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys

配列:

Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser  
 20 25 30  
 Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe  
 35

【0138】配列番号: 29

配列の長さ: 32

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp  
 1 5 10 15  
 Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg  
 20 25 30  
 Ala Phe 50

1 5 10

【0137】配列番号: 28

配列の長さ: 38

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

30 配列の特徴: 本ペプチド、及び本ペプチドをフラグメントとして含むペプチド。次の配列において、16番のCysと33番のCysとがジスルフィド結合している。

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、10番のCysと27番のCysとがジスルフィド結合している。



28

トとして含むペプチド。次の配列において、配列の長さ 36 であって 9 番、26 番、及び 35 番に Cys を有するペプチドの、9 番の Cys と 26 番の Cys とがジスルフィド結合し、上記配列の長さ 36 のペプチドの 35 番の Cys が、配列の長さ 11 であって 10 番に Cys を有するペプチドの 10 番の Cys とがジスルフィド結合している。

Val	Ser	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn
1				5					10					15
Met	Arg	Lys	Val	Arg	Gly	Pro	Pro	Val	Ser	Cys	Ile	Lys	Arg	Asp
				20					25					30

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala

トとして含むペプチド。次の配列において、R01 はCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

Lys R01 R01 R01 Lys

1 5

### 技術表示箇所

5/117

7/06

7/08

14/79

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業  
株式会社生物科学研究所内

神奈川縣座間市東原 5-1-83 森永乳業  
株式會社生物科學研究所內



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**